Tome 72, fascicule 1 (à la mémoire d'Emile Guyénot), n° 12. — Avril 1965

Croissance embryonnaire et croissance cancéreuse en culture organotypique[1]

par

Etienne WOLFF

Institut d'embryologie expérimentale, Nogent-sur-Marne.

Avec 8 figures dans le texte

Depuis 1950, nous avons cultivé, mes collaborateurs et moi-même, de nombreux organes embryonnaires et de nombreuses tumeurs animales et humaines. Les milieux et les conditions favorables à ces cultures sont les mêmes pour les deux catégories d'explants. On est donc en droit de comparer les modalités de leur croissance. Un fait se dégage immédiatement de cette comparaison: dans les mêmes conditions de milieu, les organes embryonnaires ont toujours une croissance limitée, un grand nombre de tumeurs ont une croissance illimitée. Ce sont ces deux propriétés que nous analyserons dans cet article.

I — LA CROISSANCE LIMITÉE DES ORGANES EMBRYONNAIRES

Contrairement à la culture de cellules (culture histiotypique ou inorganisée), la culture organotypique est toujours limitée dans le temps et dans l'espace. Rappelons sommairement les conditions de notre méthode.

[1] En hommage admiratif à la mémoire du professeur Emile Guyénot.

Le milieu est constitué d'un gel d'agar préparé dans une solution physiologique. On y incorpore de l'extrait d'embryon, parfois du sérum, dans les proportions suivantes:

Agar à 1% dans la solution de Gey	7 volumes
Extrait d'embryon de Poulet de 8 à 10 jours .	3 volumes
Liquide de Tyrode	0 à 3 volumes
Sérum de Cheval (ou autre)	3 à 0 volumes
TOTAL	13 volumes

L'organe ou le fragment d'organe embryonnaire est déposé sur la surface du gel d'agar, auquel il adhère intimement. Il se nourrit par sa partie inférieure des substances nutritives contenues dans le milieu, il respire par sa partie supérieure l'air atmosphérique contenu dans le récipient de culture.

Le fait que l'organe ne respire que par sa surface extérieure empêche l'explant de dépasser un certain volume, et cette limitation est due aux conditions de l'expérience. Ainsi un tibia d'embryon de poulet, mis en culture le 8e jour de l'incubation, augmentera sa longueur de 4,45 mm à 7 mm en 7 jours; après quoi sa croissance s'arrêtera (M. KIENY, 1958). Une gonade prélevée à 7 jours croîtra en longueur et en épaisseur pendant 5 à 8 jours, effectuera pendant ce temps sa différenciation sexuelle mâle ou femelle; mais sa croissance sera définitivement arrêtée, même si l'organe peut encore survivre une à deux semaines.

Il ne faudrait cependant pas penser que l'arrêt de croissance de ces organes est dû uniquement à des échanges respiratoires déficients. Car, si l'on morcèle, dès le début de la culture, l'organe embryonnaire en petits fragments minces et transparents, chaque partie isolée n'évoluera pas plus longtemps que l'ensemble. Certains organes ou tissus minces, comme la peau, les jeunes gonades, le foie très jeune, ou creusés de cavités naturelles, comme l'intestin, le poumon, la syrinx, se prêtent à de telles expériences, sans qu'il soit nécessaire de les fragmenter. S'il s'agit d'organes plus massifs, tels le mésonephros ou le foie de 8 jours, on peut les découper en tranches fines, que l'on juxtapose ensuite sur le milieu: elles se réassemblent en une sorte de lame plate et large, moins sujette à l'asphyxie qu'un organe massif. C'est pour parer à la tendance qu'ont les explants à se ramasser en boule sur le milieu que j'ai

préconisé une modalité technique nouvelle: celle qui consiste à cultiver l'explant sur une membrane vitelline d'œuf de poule (Et. Wolff, 1962). Une partie de la membrane est interposée entre le milieu et les explants, une autre les recouvre. Ainsi emballés, les explants ont tendance à s'étaler au maximum. Ils forment une sorte de gâteau plat qui s'accroît par ses bords.

Quelle que soit la méthode employée pour diminuer l'épaisseur des explants, on constate qu'ils croissent et survivent pendant un temps limité. La durée de survie est variable, suivant la nature des organes cultivés. Elle varie en général de 8 jours à 20 jours, exceptionnellement elle peut atteindre plus d'un mois (cas de la syrinx du canard et du poulet). La différenciation et la croissance sont de durée beaucoup plus courte. La différenciation continue en général plus longtemps que la croissance. Celle-ci atteint son maximum, pour la plupart des organes, entre le 3e et le 5e jour de la culture, elle s'arrête après le 7e jour. Il est rare de voir un explant augmenter sensiblement de volume après ce délai, et les tissus ne présentent plus alors que de rares mitoses.

Il semble que, passé ce stade, on ne peut réveiller la croissance et la prolifération d'un organe par aucun artifice: morcellement des organes, repiquages, enrichissement des milieux. Cette affirmation se fonde sur de nombreuses expériences, tentées sur de nombreux organes.

Les auteurs qui ont employé d'autres méthodes et d'autres milieux que nous arrivent aux mêmes conclusions: la croissance et la survie d'un organe en culture sont strictement limitées.

Il semble qu'un organe, soustrait à son milieu naturel, l'organisme, possède un dynamisme limité. Il ne peut franchir seul qu'une certaine étape de croissance, après quoi son potentiel est épuisé. C'est ce que montre très nettement une expérience de ma collaboratrice Fl. Dameron. Elle soumet des tibias de poulet à des températures basses pendant des temps variables, après le début de la culture. Les tibias témoins, incubés à la température normale de 38°, ont une courbe de croissance représentée sur la fig. 1. Ceux qui sont placés pendant un temps variable à la température de 15° ont leur croissance interrompue pendant la durée de ce traitement. Remis à la température normale de 38,5° ils reprennent leur croissance et la poursuivent jusqu'à rejoindre la longueur des témoins. Les courbes sont simplement décalées (fig. 1). Il semble que les tibias

isolés ont une certaine « réserve de croissance », qui reste constante dans les conditions de cette expérience. Les tibias possèdent une certaine capacité de croissance, que traduit la courbe de croissance à la température optima de 38,5° C. Cette courbe correspond à la croissance optima dans les conditions de nos milieux de culture, mais non à l'optimum de croissance que peut atteindre un tibia dans d'autres conditions expérimentales. Telle quelle, cependant, elle

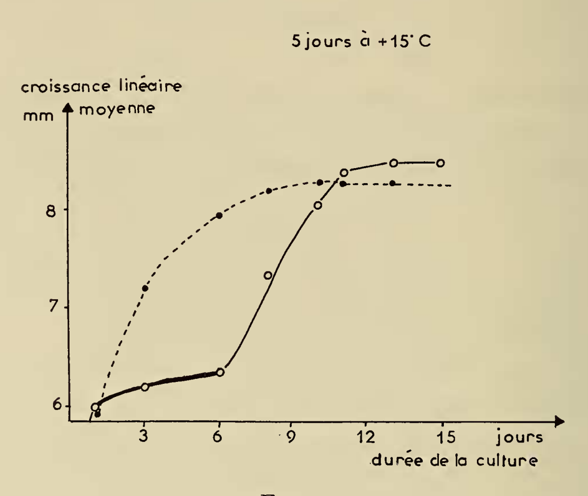


Fig. 1

Croissance linéaire moyenne de 9 tibias *in vitro*. En pointillé, courbe de croissance à la température de +38,5° C. En trait plein, courbe de croissance de 9 tibias controlatéraux soumis à la température de +15° C du 2e au 7e jour de culture (trait fort), puis replacés à +38,5° C.

(D'après F. Dameron)

marque un plafond qui peut être rejoint, rarement dépassé (fig. 1 et 2), par des tibias maintenus à des températures défavorables, puis replacés à la température normale.

Si le séjour à de telles températures n'altère pas l'explant, la capacité ou réserve de croissance manifeste toutes ses potentialités, la courbe rejoint l'optimum. Si l'on place les tibias 10 jours à la température de 15°, la « réserve de croissance » se trouve affaiblie, la courbe reste toute entière au-dessous de la courbe témoin (fig. 3).

La réserve de croissance atteint généralement son maximum dans l'organisme normal qui permet à un organe d'atteindre son

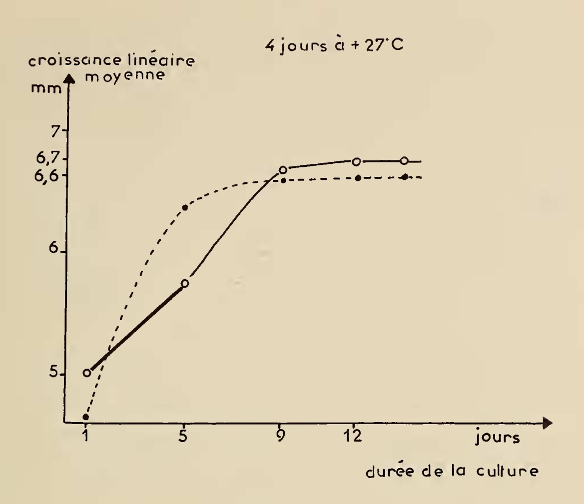


Fig. 2

Croissance moyenne de 18 tibias soumis temporairement à une température de +27°, puis replacés à 38,5° (trait plein). En trait fort, durée du séjour à 27°. En trait pointillé, courbe de croissance des 18 tibias témoins à la température de 38,5°.

(D'après F. Dameron)

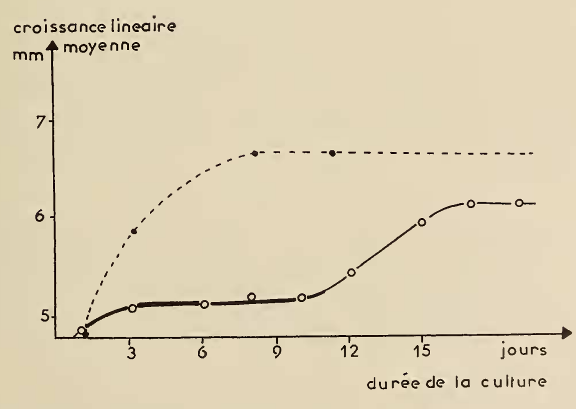


Fig. 3

Courbe de croissance moyenne de 7 tibias soumis pendant 10 jours à la température de +15° (trait fort), puis replacés à 38,5° (trait plein).

En pointillé, courbe de croissance de 7 tibias témoins à la température de 38,5° C.

(D'après F. Dameron)

plus grand développement. Mais ceci n'est exact ni pour tous les organes, ni pour tous les stades de développement. (Songeons aux actions inhibitrices, hormonales et autres, que subissent bien des organes au cours de leur croissance).

D'autre part, on ignore quelles proportions et quelle longévité pourrait atteindre un organe placé dans des conditions de culture meilleures que celles de nos méthodes actuelles, telles que perfusion durable de sang ou d'un liquide de mêmes propriétés. Nous constatons simplement qu'avec nos techniques actuelles, la croissance et la survie d'un explant organisé sont limitées.

En résumé, alors que de nombreux auteurs depuis A. Carrel ont obtenu la culture *in vitro* de longue durée, voire indéfinie, de souches cellulaires inorganisées, aucun auteur n'a encore réussi à faire développer au-delà d'une période de quelques semaines des organes ou des fragments d'organes explantés *in vitro*. Le morcellement et le repiquage des fragments ne « relancent » pas sensiblement le pouvoir de prolifération des explants. On peut conclure que cette limitation est due non seulement aux facteurs externes du milieu, mais aussi à certains facteurs internes en rapport avec l'organisation.

II — LA CROISSANCE ILLIMITÉE DES NODULES CANCÉREUX

Depuis 1956, nous cultivons des tumeurs animales et humaines exactement sur les mêmes milieux que les organes embryonnaires du poulet. Plus précisément, c'est aux dépens de ces organes que les tumeurs se nourrissent. Le premier temps de la technique consiste précisément à explanter *in vitro* des organes embryonnaires de poulet. On ensemence ensuite des fragments de tumeurs sur le milieu vivant fourni par les explants d'organes. Nous avons utilisé de préférence des fragments de mésonephros de poulet de 8 jours ½, mais d'autres organes se sont révélés favorables à la culture de tissus cancéreux.

Une autre modalité de la technique consiste à interposer entre les explants de tissus embryonnaires et les fragments cancéreux une membrane dialysante, qui, empêchant le contact entre les deux types d'explants, permet le passage de substances diffusibles des uns aux autres.

Dans de très nombreux cas, les explants tumoraux se sont développés et ont proliféré. Ils conservent toujours la *structure* que possédait la tumeur initiale. D'autre part ils constituent des nodules massifs qui s'accroissent dans les trois directions de l'espace. Il s'agit donc bien d'une culture de cancers *organisés*.

Nous avons tenté de repiquer les cultures de tumeurs sur de nouveaux milieux garnis de mésonephros frais. Des résultats positifs ont été obtenus avec de nombreuses tumeurs de souris, de rat, avec des cancers humains. Alors que la prolifération des organes en culture s'arrête en général après 7 à 10 jours, la prolifération des nodules cancéreux peut se continuer pendant des semaines et des mois. Le sarcome S 180 de Souris a été repiqué pendant plus de 3 mois. D'autres tumeurs de Souris, de Rat, en particulier l'adénocarcinome mammaire T 2633, l'hépatome de Zajdela, ont été cultivés pendant des temps variant entre 6 et 7 mois. En ce qui concerne les tumeurs humaines, trois cancers ont été cultivés respectivement pendant 16 mois, 15 mois, 37 mois: un épithélioma muqueux du côlon, un adénocarcinome pulmonaire, une métastase hépatique d'origine gastrique.

Deux d'entre eux continuent à être entretenus et prolifèrent activement. Ce sont l'épithélioma du côlon (16 mois) la métastase du cancer gastrique (37 mois). Le nombre d'explants a été multiplié considérablement depuis le début de l'expérience. Il pourrait l'être de manière illimitée. Seules des raisons pratiques nous obligent d'en restreindre la prolifération. Pratiquement, ces cultures ont atteint le stade où l'on peut affirmer que la prolifération sera indéfinie. Les explants présentent toujours la structure typique qu'ils avaient au début de l'expérience (fig. 4, 5 et 6).

Contrairement aux cultures d'organes embryonnaires, les cultures organotypiques de cancers montrent donc un pouvoir de *prolifération illimité dans le temps et dans l'espace.*

On remarquera en outre que, dans les prélèvements initiaux de cancers humains ou animaux, de nombreuses cellules normales sont explantées en même temps que les cellules cancéreuses. Ce sont en particulier des cellules du stroma conjonctif ou d'autres structures. Elles disparaissent très rapidement des cultures dès le 1er ou le 2e repiquage, laissant libre champ aux cellules cancéreuses qui seules subsistent. Dans le cas des cultures où le cancer est séparé

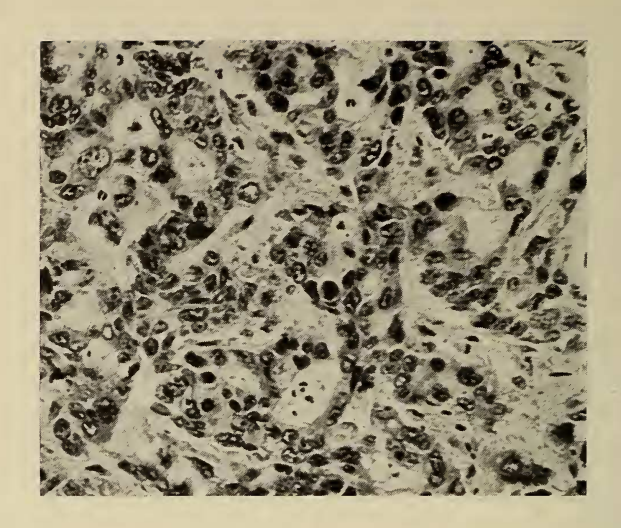


Fig. 4

Biopsie de la métastase hépatique Z 200 d'origine gastrique. Cordons épithéliaux lâches limitant des cavités irrégulières. G: 235 ×



Fig. 5

La même tumeur en culture *in vitro*.
Les structures sont les mêmes, mais plus ordonnées et plus régulières. Le tissu cancéreux est débarrassé des cellules normales étrangères à la tumeur. G: 225 ×.



Fig. 6

Aspect macroscopique de la tumeur Z 200, après 31 repiquages. Deux nodules ont fusionné. G: 30 ×.



Fig. 7

Culture de la tumeur Z 200, séparée du mésonephros par une membrane filtrante, après 75 repiquages. La culture pure de cellules cancéreuses conserve son organisation épithéliale, avec ses alvéoles sécrétrices de mucus, et son intense pouvoir de prolifération. G: 120 ×.

du mésonephros par une membrane, on obtient des cultures pures de cancers organisés (fig. 7 et 8).

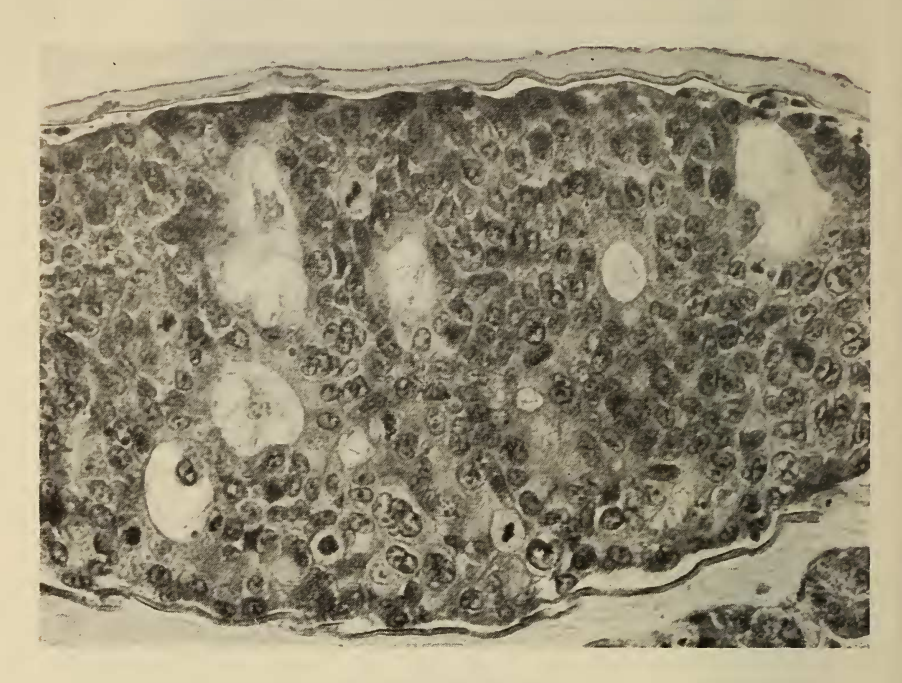


Fig. 8

Même type de culture de la tumeur Z 200, après 72 repiquages. Détail montrant l'organisation de la tumeur en un massif épithélioïde creusé de cavités et peuplé de mitoses nombreuses, signe d'une intense prolifération. G: 315 ×.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Des résultats qui viennent d'être résumés dans cet article, on peut tirer une conclusion importante. Les cultures d'organes embryonnaires et de tissus organisés adultes de Vertébrés amniotes ne peuvent être maintenues en vie que pendant un temps limité atteignant au plus quelques semaines (la durée de leur prolifération ne dépasse généralement pas 7 à 10 jours). Par contre des cultures de cancers organisés peuvent proliférer d'une manière illimitée dans le temps et dans l'espace.

Ces résultats montrent une différence fondamentale entre les tissus cancéreux et les tissus normaux à l'état organisé. Une telle

différence n'existe pas entre les cultures de cellules normales et cancéreuses à l'état inorganisé.

Quelles sont les raisons de cette différence de comportement entre organes normaux et nodules cancéreux? On peut invoquer le fait que des organes embryonnaires en culture manifestent une limitation de croissance qui est inhérente à leur organisation. Ces limitations se manifestent à des degrés divers dans l'organisme entier normal et dans différentes conditions de milieu.

Par contre, nos résultats démontrent que les structures cancéreuses organisées échappent à de telles limitations. Elles ne contiennent donc pas, même en dehors de l'organisme, de facteurs limitant la croissance.

On pourrait objecter qu'une structure cancéreuse ne tend pas vers une forme définie, même lorsqu'elle présente une certaine organisation. Au contraire, l'organe réalise un équilibre bien défini entre ses cellules qui tendent à édifier une forme précise. Mais on peut obtenir, comme nous l'avons vu, des cultures de mésonephros, de foie, qui n'ont aucune forme définie, tout en étant organisées: leurs structures se répètent sans ordre. Ces cultures ne manifestent pas moins la même limitation que les autres organes, quant à leur pouvoir de prolifération.

Nous retrouvons ainsi, dans le cas des cultures organisées, une propriété fondamentale des tissus cancéreux. La différence qu'ils manifestent avec les tissus normaux peut servir à caractériser la nature cancéreuse d'un tissu, et peut-être à la diagnostiquer. Le comportement des cultures organotypiques fournit une nouvelle propriété différentielle entre le normal et le cancéreux. Nous ne pouvons aller actuellement plus avant dans l'analyse de cette différence, mais notre méthode, montrant que le cancer garde, en dehors de l'organisme, ses propriétés et son dynamisme de prolifération, permet de poser le problème sur un plan nouveau.

RÉSUMÉ

Les organes embryonnaires de Vertébrés Amniotes, explantés suivant les techniques de culture organotypique, ont une croissance et une survie limitées, qui dépassent rarement 2 à 3 semaines. Il en est de même des cultures de tissus organisés de l'adulte.

Par contre, les cultures de nodules cancéreux *organisés* peuvent se multiplier très longtemps (37 mois pour l'une d'elles), et probablement indéfiniment, en conservant leur structure et leurs propriétés: la démonstration en est donnée pour plusieurs cancers de Souris et de Rat, et pour trois tumeurs humaines.

Les tumeurs malignes manifestent donc *in vitro*, en culture organotypique, des propriétés de croissance différentes des organes et tissus normaux: prolifération illimitée des tumeurs malignes, croissance et survie limitées des organes et tissus normaux.

BIBLIOGRAPHIE

Les principales publications de mon laboratoire auxquelles se réfère le présent article sont les suivantes:

I. *En ce qui concerne les cultures d'organes embryonnaires*

DAMERON, F. 1960. *Influence de la température sur les organes cultivés in vitro. 1. La croissance des tibias.* Acta Embr. Morph. exp. 3: 86-117.

KIENY, M. 1958. *Contribution à l'étude des besoins nutritifs des tibias embryonnaires d'Oiseau cultivés en milieux naturels et synthétiques.* Arch. Anat. micr. Morph. exp. 47: 85-169.

STENGER-HAFFEN, K. 1957. *Etude des besoins nutritifs des gonades embryonnaires d'Oiseau cultivées en milieux synthétiques.* Arch. Anat. micr. Morph. exp. 46: 521-607.

WOLFF, Em. 1957. *Nouvelles recherches sur la culture organotypique de la syrinx d'Oiseau. Culture sur différents milieux naturels et amélioration de ces milieux par des acides aminés.* Arch. Anat. micr. Morph. exp. 46: 1-38.

— 1957. *La différenciation sexuelle de la syrinx de l'embryon de canard explantée in vitro sur milieux chimiquement définis.* Bull. Biol. 91: 271-283.

WOLFF, Et. 1952. *Sur la différenciation sexuelle des gonades de Souris explantées in vitro.* C. R. Acad. Sc. 234: 1712-1714.

— 1952. *La culture d'organes embryonnaires in vitro.* Rev. Sc. 90: 189-198.

— 1953. *Principes d'une méthode de culture d'organes embryonnaires en milieux synthétiques.* C. R. Soc. Biol. 147: 857-861.

— 1954. *La culture des organes embryonnaires in vitro.* Conf. Palais de la Découverte (20.3.1954).

— 1956. *La croissance et la différenciation des organes embryonnaires en culture in vitro.* Exposés Biol. cell. (A. Thomas): 157-188.

Wolff, Et. et Haffen, K. 1951. *Sur la culture in vitro des glandes génitales des embryons d'Oiseau : obtention de la différenciation sexuelle et de l'intersexualité expérimentale des gonades explantées.* C. R. Acad. Sc. 233: 439-441.

— et Haffen, K. 1952. *Sur le développement et la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires d'Oiseau en culture in vitro.* J. exp. Zool. 119: 381-399.

— et Haffen, K. 1952. *Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires in vitro.* Texas Rep. Biol. Med. 10: 463-472.

— Haffen, K., Kieny, M. et Wolff, Em. 1953. *Sur les cultures d'organes embryonnaires en milieu synthétique.* C. R. Acad. Sc. 236: 137-139.

— Haffen, K. et Wolff, Em. 1953. *Les besoins nutritifs des organes sexués embryonnaires en culture in vitro.* Ann. Alim. Nutrit. 7: 5-22.

— et Wolff, Em. 1952. *Le déterminisme de la différenciation sexuelle de la syrinx du canard en culture in vitro.* Bull. Biol. 86: 325-350.

— Wolff, Em. et Haffen, K. 1951. *Sur la différenciation in vitro de la syrinx chez l'embryon de Canard.* C. R. Acad. Sc. 233: 500-502.

II. *En ce qui concerne les cultures de tumeurs malignes*

Wolff, Et. 1956. *Essais de culture d'une tumeur de Souris sur des organes embryonnaires de Poulet cultivés in vitro.* C. R. Acad. Sc. 242: 1537-1538.

— 1956. *La culture des cellules tumorales sur des explants d'organes in vitro.* Experientia 12: 321-322.

— 1958. *Association d'organes et de tumeurs in vitro.* Conf. Palais de la Découverte (28.6.1958).

— 1960. *Sur une nouvelle modalité de la culture organotypique.* C. R. Acad. Sc. 250: 3881-3882.

— 1961. *Utilisation de la membrane vitelline de l'œuf de poule en culture organotypique. I. Technique et possibilités.* Develop. Biol. 3: 767-786.

— 1962. *Culture of tumors on embryonic organs explanted in vitro.* in « Biological interactions in normal and neoplastic growth ». Henry Ford Hospital Intern. Symp. Little, Brown and Co.: 413-435.

— 1962. *Long-term organotypic cultures of human surgical tumors at the expense of substances elaborated by the mesonephros of the chick embryo.* Discussion of J. Leighton's report, Symposium on organ culture. 13 th annual meeting of the Tissue Culture Association, Washington. May 29-31. National Canc. Inst. monograph. 11: 180-195.

WOLFF, Et. 1963. *La culture organotypique de tumeurs humaines sur des organes embryonnaires de Poulet.* Colloque Franco-Soviétique, Moscou, juillet 1962 in « Quelques problèmes posés par la cellule cancéreuse ». Gauthier-Villars: 103-118.

— BARSKI, G. et WOLFF, Em. 1960. *Mise en évidence de différents degrés de malignité de souches cellulaires de Souris en culture d'organes embryonnaires de Poulet.* C. R. Acad. Sc. 251: 479-481.

— et SCHNEIDER, N. 1957. *La culture d'un sarcome de Souris sur des organes de Poulet explantés in vitro.* Arch. Anat. micr. Morph. exp. 46: 173-197.

— et SCHNEIDER, N. 1957. *La transplantation prolongée d'un sarcome de Souris sur des organes embryonnaires de Poulet cultivés in vitro.* C. R. Soc. Biol. 151: 1291-1292.

— et SIGOT, M. F. 1961. *Comportement de différents types de tumeurs de Rongeurs associés à du rein embryonnaire de poulet en culture in vitro.* C. R. Soc. Biol. 155: 265-267.

— et WOLFF, Em. 1958. *La propagation d'une souche de cancer humain sur des organes embryonnaires de Poulet cultivés in vitro.* C. R. Acad. Sc. 246: 1116-1118.

— et WOLFF, Em. 1958. *Les résultats d'une nouvelle méthode de culture de cellules cancéreuses in vitro.* Rev. fr. Etud. clin. biol. 3: 945-951.

— et WOLFF, Em. 1961. *Culture de cancers humains sur du rein embryonnaire de Poulet explanté in vitro.* Presse médicale, 69: 1123-1126.

— et WOLFF, Em. 1961. *Le rôle du mésonéphros de l'embryon de Poulet dans la nutrition de cellules cancéreuses. II. Etude par la méthode de la membrane vitelline.* J. Embryol. exp. Morph. 9: 678-690.

— et WOLFF, Em. 1962. *Sur la culture pure organotypique de nodules cancéreux humains in vitro.* C. R. Acad. Sc. 254: 3452-3453.

— et WOLFF, Em. 1962. *La culture prolongée de cancers humains sur le mésonéphros de l'embryon de Poulet explanté in vitro.* C. R. Soc. Biol. 156: 240-241.

— et WOLFF, Em. 1963. *Sur la culture de longue durée d'un cancer humain in vitro.* C. R. Acad. Sc. 256: 1173-1174.

— et WOLFF, Em. 1963. *Les facteurs de la croissance de tumeurs associées à des organes embryonnaires de Poulet.* « Intern. Soc. for Cell. Biology ». Acad. Press, New-York: 179-198.

— et WOLFF, Em. 1964. *Nouveaux résultats de la culture organotypique de cancers humains.* C. R. Acad. Sc. 258: 2439-2441.

— WOLFF, Em. et RENAULT, P. 1962. *Sur la culture organotypique de carcinomes humains très proliférants, en présence de mésonéphros d'embryons de Poulet.* Path. Biol. 10: 1161-1169.

WOLFF, Et., WOLFF, Em., ZAGURY, D. et LEGER, L. 1962. *Recherches sur les conditions de la culture organotypique de cancers humains. I. Possibilités de la méthode.* Presse Med. 70: 2387-2389.

— WOLFF, Em., ZAGURY, D. et LEGER, L. 1962. *Recherches sur les conditions de la culture organotypique de cancers humains. II. Etude au microscope électronique.* Presse Méd. 70: 2759-2762.